

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-160737

(43)公開日 平成10年(1998) 6月19日

(51)Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 33/553

G 0 1 N 33/553

C 1 2 M 1/00

C 1 2 M 1/00

Z

C 1 2 Q 1/00

C 1 2 Q 1/00

Z

G 0 1 N 33/543

5 9 5

G 0 1 N 33/543

5 9 5

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 7 頁)

(21)出願番号

特願平8-323098

(22)出願日

平成8年(1996)12月3日

(71)出願人 000002897

大日本印刷株式会社

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号

(72)発明者 中村 瑠奈

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号

大日本印刷株式会社内

(72)発明者 吉原 俊夫

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号

大日本印刷株式会社内

(72)発明者 永田 良平

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号

大日本印刷株式会社内

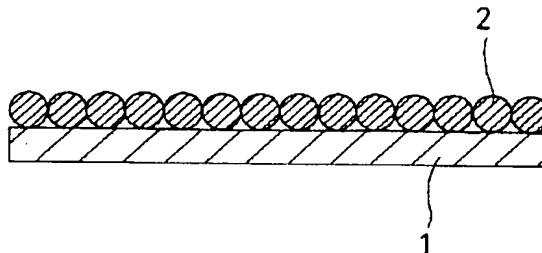
(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54)【発明の名称】 光学的分析装置用測定チップ及びその製造方法

(57)【要約】

【解決手段】 官能基を表面に導入した金属コロイド粒子を、基板上に最密充填的に並べたことを特徴とする光学的分析装置用測定チップ、ならびに金属コロイド粒子を分散させた分散液と、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン及び3-(2-アミノエチルアミノプロピル)ジメトキシメチルシランからなる群から選ばれる少なくとも1種とを混合して、金属コロイド粒子の表面にアミノ基を導入し、得られたアミノ基導入金属コロイド粒子分散液を溶媒と混合して又は混合しないで基板上に塗布することを特徴とする光学的分析装置用測定チップの製造方法。

【効果】 良好な感度を有する光学的分析装置用測定チップを、効率良く簡易に得ることができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 官能基を表面に導入した金属コロイド粒子を、基板上に最密充填的に並べたことを特徴とする、光学的分析装置用測定チップ。

【請求項2】 基板上に並べられた前記金属コロイド粒子が、上下方向に重なっていないことを特徴とする、請求項1記載の光学的分析装置用測定チップ。

【請求項3】 前記金属コロイド粒子と基板との間に、接着層が設けられていることを特徴とする、請求項1記載の光学的分析装置用測定チップ。

【請求項4】 前記官能基がアミノ基又はメルカプト基であることを特徴とする、請求項1記載の光学的分析装置用測定チップ。

【請求項5】 金属コロイド粒子を分散させた分散液と、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン及び3-(2-アミノエチルアミノプロピル)ジメトキシメチルシランからなる群から選ばれる少なくとも1種とを混合することにより、金属コロイド粒子の表面にアミノ基を導入することを特徴とする、アミノ基導入金属コロイド粒子の製造方法。

【請求項6】 金属コロイド粒子を分散させた分散液と、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン及び／又はジメトキシ-3-メルカプトプロピルメチルシランとを混合することにより、金属コロイド粒子の表面にメルカプト基を導入することを特徴とする、メルカプト基導入金属コロイド粒子の製造方法。

【請求項7】 金属コロイド粒子を分散させた分散液と、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン及び3-(2-アミノエチルアミノプロピル)ジメトキシメチルシランからなる群から選ばれる少なくとも1種とを混合して、金属コロイド粒子の表面にアミノ基を導入し、得られたアミノ基導入金属コロイド粒子分散液を溶媒と混合して又は混合しないで基板上に塗布することを特徴とする、光学的分析装置用測定チップの製造方法。

【請求項8】 金属コロイド粒子を分散させた分散液と、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン及び／又はジメトキシ-3-メルカプトプロピルメチルシランとを混合して、金属コロイド粒子の表面にメルカプト基を導入し、得られたメルカプト基導入金属コロイド粒子分散液を溶媒と混合して又は混合しないで基板上に塗布することを特徴とする、光学的分析装置用測定チップの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、光学的分析装置用の測定チップ、その製造方法及び光学的分析装置用測定チップに使用することのできる官能基導入金属コロイド粒子の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、臨床検査等で免疫反応を利用した測定が数多く行われているが、従来法では煩雑な操作や標識物質を必要とするため、標識物質を必要とすることなく、生理活性物質の変化を高感度に検出することのできる光学的分析装置、例えば表面プラズモン共鳴(SPR)を利用した免疫センサーなどが使用されている。

【0003】このような光学的分析装置における測定チップは、一般的には、下から透明基板、金属薄膜及び有機薄膜からなる構成を有し、分析対象物に応じた生理活性物質を有機薄膜に固定してなる。このような構成を有する測定チップは、基板上に金属薄膜を真空蒸着等で成膜した後、有機薄膜を形成して金属薄膜に官能基を付与し、その官能基に種々の生理活性物質を固定化することにより製造している。しかしながら、従来の測定チップでは構成上、金属薄膜と生理活性物質との距離が遠く、感度が十分ではなかった。また、その製造方法においても、真空蒸着等の操作は煩雑であり、成膜効率も悪かった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、良好な感度を有するとともに、効率良く製造することのできる光学的分析装置用測定チップ、及びその製造方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決する手段】上記課題に鑑み鋭意研究の結果、本発明者等は、金属コロイド粒子の表面に官能基を導入し、その金属コロイド粒子を基板上に最密充填的に並べることにより、感度が非常に高くなること、ならびに表面に官能基を導入した金属コロイド粒子を含む液体を基板上に塗布すれば、有機薄膜の形成を別途行う必要がなく、金属薄膜及び官能基の形成を同時に行うことができ、測定チップを効率良く、簡易に製造できることを見出し、本発明を完成した。即ち、本発明は、官能基を表面に導入した金属コロイド粒子を、基板上に最密充填的に並べたことを特徴とする、光学的分析装置用測定チップである。

【0006】また、本発明は、金属コロイド粒子を分散させた分散液と、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン及び3-(2-アミノエチルアミノプロピル)ジメトキシメチルシランからなる群から選ばれる少なくとも1種とを混合することにより、金属コロイド粒子の表面にアミノ基を導入することを特徴とする、アミノ基導入金属コロイド

粒子の製造方法である。

【0007】さらに、本発明は、金属コロイド粒子を分散させた分散液と、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン及び／又はジメトキシ-3-メルカプトプロピルメチルシランとを混合することにより、金属コロイド粒子の表面にメルカプト基を導入することを特徴とする、メルカプト基導入金属コロイド粒子の製造方法である。

【0008】さらに、本発明は、金属コロイド粒子を分散させた分散液と、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン及び3-(2-アミノエチルアミノプロピル)ジメトキシメチルシランからなる群から選ばれる少なくとも1種とを混合して、金属コロイド粒子の表面にアミノ基を導入し、得られたアミノ基導入金属コロイド粒子分散液を溶媒と混合して又は混合しないで基板上に塗布することを特徴とする、光学的分析装置用測定チップの製造方法である。

【0009】さらに、本発明は、金属コロイド粒子を分散させた分散液と、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン及び／又はジメトキシ-3-メルカプトプロピルメチルシランとを混合して、金属コロイド粒子の表面にメルカプト基を導入し、得られたメルカプト基導入金属コロイド粒子分散液を溶媒と混合して又は混合しないで基板上に塗布することを特徴とする、光学的分析装置用測定チップの製造方法である。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明における光学的分析装置とは、分析対象物との相互作用による生理活性物質の変化を、光の波長によって光学的に分析する装置をいい、例えば表面プラズモン共鳴測定機、紫外分光器、赤外分光器、可視光分光器、蛍光分光器、ラマン分光器等が該当する。また、光学的分析装置用測定チップとは、その光学的分析装置において、分析対象物と生理活性物質とが相互作用し得る光学部分（光が照射・反射される部分）を含む部材をいい、光学的分析装置の本体に固着されるものであってもよいし、脱着可能なものであってもよい。

【0011】本発明の一例による光学的分析装置用測定チップの断面概略図を図1に示す。本実施例による光学的分析装置用測定チップ（以下、「測定チップ」と略す場合がある。）は、基板1の上に官能基導入金属コロイド粒子2を並べてなる。基板1としては、通常光学的分析装置用の測定チップに使用されるものであればよく、一般的にはレーザー光に対して透明な材料、例えばガラスやプラスチックからなるものである。基板1の好ましい厚さは、約0.1～5mmである。

【0012】官能基導入金属コロイド粒子2は、官能基を金属コロイド粒子の表面に導入したものである。金属

コロイド粒子とは、コロイドサイズ領域（10～1000nm）の大きさにある金属粒子をいう。金属コロイド粒子の金属の種類としては、光学的分析を行うことができる金属であればいかなるものであってもよいが、通常金、白金、銀、アルミニウム等を単独で又は組み合わせて使用する。好ましくは、金を使用する。このような官能基導入金属コロイド粒子2を用いることにより、官能基に結合する生理活性物質が金属コロイド粒子に極めて近い位置に固定されることになり、金属薄膜・有機薄膜を使用する場合よりも測定感度を大幅に向上させることができる。

【0013】金属コロイド粒子は、クエン酸ナトリウムを還元剤として用いる方法（Frens, G. : Nature Physica Sci. 241, 20-22, (1973)）や、クエン酸ナトリウム及びタンニンを用いる方法（J. W. Slot, H. T. Geuze, : Eur. J. Cell Biol. 38, 87-93, (1985)）等によって製造することができる。前者の方法では、例えば0.01～5%塩化金酸（ $\text{HAuCl}_4$ ）の水溶液1000容量部を煮沸し、0.1～5%クエン酸ナトリウム2～10容量部を加え、さらに5～20分間煮沸した後、室温で放冷する。この方法では、還元剤であるクエン酸ナトリウムの添加量によってコロイド粒子の直径を制御する。還元剤の添加量が少ないほど、直径が大きくなる。

【0014】後者の方法では、例えば、まず0.01～5%塩化金酸（ $\text{HAuCl}_4$ ）水溶液5重量部を蒸留水395重量部に混合し、60℃に加熱する（溶液X）。次に、0.01～5%クエン酸ナトリウム水溶液20重量部、0.01～5%タンニン酸水溶液2.5重量部及び蒸留水77.5重量部を混合し、60℃に加熱する（溶液Y）。得られた溶液Xを攪拌しながら溶液Yを速やかに混合し、溶液の色が薄い黄色から紫ないし赤色に変わるまで攪拌した後、沸騰するまで加熱し、目的の金コロイド粒子を得る。これらの方法以外にも、特開昭55-15100号公報、特開平4-142460号公報、特開平4-221761号公報記載の方法等によっても製造することができる。官能基の種類としては、金属コロイド粒子に所望の生理活性物質を固定することができるものであればいかなる種類であってもよいが、好ましくはアミノ基又はメルカプト基を使用する。アミノ基は、特にアスパラギン酸、グルタミン酸等が一次構造に含まれる生理活性物質あるいは抗体、核酸などの生体関連物質のC（カルボキシ）末端に対して強固な結合を呈するという点で好ましく、メルカプト基は、特にシステイン、メチオニン等が一次構造に含まれる生理活性物質に対して強固な結合を呈するという点で好ましい。

【0015】金属コロイド粒子の表面に官能基を導入するには、金属コロイド粒子を分散させた分散液と、所望の官能基を有する試薬（官能基導入用試薬）とを混合すればよい。金属コロイド粒子を分散させるための溶媒（この溶媒を、溶媒(a)という。）としては、水溶性溶剤（アルコール、ケトン、エーテルもしくはそれらの誘

導体)、蒸留水又は界面活性剤水溶液、例えばイソプロピルアルコール等を使用することができる。溶媒(a)の使用量としては、金属コロイド粒子が約0.1～10重量%となるような量であればよい。

【0016】アミノ基を導入する場合の試薬としては、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)ジメトキシメチルシラン等が挙げられ、それぞれ単独で又は適宜組み合わせ使用することができる。また、メルカプト基を導入する場合の試薬としては、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン、ジメトキシ-3-メルカプトプロピルメチルシラン等が挙げられ、それぞれ単独で又は適宜組み合わせ使用することができる。

【0017】これら試薬の使用量、混合温度等は、金属コロイド粒子や試薬の種類によって変化するが、試薬の使用量は、一般的に金属コロイド粒子100重量部に対して1～10重量部であるのが好ましく、混合は一般的に50～90℃で6～24時間攪拌して行うのが好ましい。これらの試薬を用いることにより、官能基は均等な密度で金属コロイド粒子の表面100 Å<sup>2</sup> 当たり1～10個導入される。金属コロイド粒子の表面に導入された官能基は、最も外側に位置する。例えば、試薬として3-アミノプロピルトリエトキシシランを使用した場合、図3に示されるように、金属コロイド粒子-酸素原子-ケイ素原子-アルキル基-アミノ基の順に結合し、アミノ基が最も外側に位置する。

【0018】本発明の測定チップでは、官能基導入金属コロイド粒子2は、基板1上に最密充填的に並んでいる。本発明でいう「最密充填的」とは、末端の官能基が最外層を占めており、金属コロイド粒子との間に他の分子が貫入する余地のないほど、それら官能基同士が密に詰まっている状態をいう。このように、官能基導入金属コロイド粒子2を基板1上に最密充填的に並べることにより、生理活性物質を高い密度で均等に固定することができ、測定感度を向上させることができる。

【0019】また、官能基導入金属コロイド粒子2は、好ましくは図1に示されるように、上下方向に重ならないように、即ち単層になるように並べる。単層にすることにより、生理活性物質と相互作用する分析対象物と、入射した光が反射する面との距離を短くすることができ、良好な感度が得られるとともに、使用する官能基導入金属コロイド粒子2の量を必要最小限に抑え、コストの低減を図ることができる。

【0020】官能基導入金属コロイド粒子2を基板1上に最密充填的に並べるには、適量の官能基導入金属コロイド粒子2を含む液体を、常法により基板1上に塗布する。即ち、金属コロイド粒子を分散させた分散液と、官

能基導入用試薬とを混合して、金属コロイド粒子の表面に官能基を導入し、得られた官能基導入金属コロイド粒子分散液をそのまま塗布するか、又は適切な溶媒(この溶媒を、溶媒(b)という。)と混合して塗布すればよい。

【0021】溶媒(b)としては、アルコール類、ケトン、エーテル又はそれらの誘導体等の水溶性溶剤や、水、あるいは各種緩衝液などを用いることができる。溶媒(b)を使用するか否かによって、また使用する溶媒(b)の種類や量によって、溶媒(溶媒(a)又は溶媒(a)及び(b))の揮発速度(金属コロイド粒子層の形成速度)を変化させることができる。溶媒(b)を使用する場合、金属コロイド粒子2の濃度が0.5～20重量%、特に3～5重量%、官能基導入用試薬の濃度が0.5～20重量%、特に3～5重量%となるように用いるのが好ましい。金属コロイド粒子2の濃度が0.5～20重量%で官能基導入用試薬の濃度が0.5～20重量%であると、基板を少なくとも1以上の金属コロイド粒子層で最密充填的に覆わせることができる。また、金属コロイド粒子2の濃度が3～5重量%で官能基導入用試薬の濃度が3～5重量%であると、基板を単層の金属コロイド粒子で最密充填的に覆わせることができる。

【0022】塗布方法としては、例えばディップコート法、スピンコート法、電着法、静電法等が挙げられる。ディップコート法やスピンコート法等を行った場合の乾燥条件は、使用した溶媒の種類によって異なるが、湿度50%以上、特に70%以上で、室温に放置又は80℃以下で加熱するのが好ましい。特に、溶媒(b)としてエチレングリコールモノエチルエーテルを使用した場合、湿度40～60%、70～90℃で加熱するのが好ましい。また、エチレングリコールモノブチルエーテルアセテートを使用した場合、湿度50～80%、70～90℃で加熱するのが好ましい。

【0023】電着法を行う場合には、基板1の上に透明電極であるITO(Indium Oxide and Tin Oxide)を設ける必要があり、屈折率の補正のため、さらにITOと官能基導入金属コロイド粒子2との間にシリカ層を設けるのが好ましい。また、静電法を行う場合には、接着性の向上のため、基板1と官能基導入金属コロイド粒子2との間にアルミナ層を設けるのが好ましい。シラン系の官能基導入用試薬は、以下のような物理的性質を有する。即ち、シラン系の試薬は、溶媒中ではシラン部位の反応性の高さにより5～6量体の塊(粒子)となって分散している。この5～6量体となった粒子系は、自己凝集能の働きによりほぼ均一な粒径(分布)を有する。

【0024】この試薬を基板1上に塗布すると、官能基の有する正荷電、シラン部位の高反応性、親・疎水性のバランスなどの影響により、アミノ基を均等密度で外層に向けた形態を呈する。そして溶媒が揮発すると、残った試薬は分子同士のファンデルワールス力によって自己

凝集を始める。凝集により縮んで空隙の生じた部分は、重なった試薬層又は隣接部分より新たに試薬(層)の供給を受け、六角形を基本に結晶成長を始める。このような試薬を使用することにより、官能基導入金属コロイド粒子2は基板1上に最密充填的に、さらには単層で並び得る。官能基導入金属コロイド粒子2が基板1上に最密充填的に並んでいることは、以下の実験によっても証明することができる。

【0025】3-アミノプロピルトリエトキシシランの代わりに、アミノ基を有さないプロピルトリエトキシシランを使用して、本発明と同様の方法により基板1上に金属コロイド粒子を塗布する。ここで使用するプロピルトリエトキシシランは強い疎水性を有する化合物であり、シリンジによる蒸留水の滴下によって、表面の濡れ程度が把握できる。本発明と同様の方法で金属コロイド粒子を塗布した表面は一樣に水滴を弾くため、金属コロイド粒子が基板全体を少なくとも1以上の層で覆っていることが分かる。なお、表面が部分的にしか水滴を弾かない場合には、撥水表面と親水表面とが混在しており、金属コロイド粒子は基板全体を均一に覆っていないと考えられる。

【0026】金属コロイド粒子2に導入された官能基には、生理活性物質が結合・固定化される。生理活性物質の固定化は、常法によって行えばよい。例えば、所定量の生理活性物質を官能基導入金属コロイド粒子に所定時間接触させることにより固定化することができる。光学的分析装置の測定セルがフローセル型であれば、一定流量の生理活性物質を所定時間(所定量)流して官能基導入金属コロイド粒子に接触させればよい。

【0027】生理活性物質としては、分析対象物と相互作用し得るものであれば特に限定されず、例えば免疫蛋白質、酵素、微生物、細菌等が挙げられる。免疫蛋白質としては、例えば分析対象物を抗原とする抗体を使用することができる。抗体としても特に限定されることなく、種々の免疫グロブリン、即ちIgG、IgM、IgA、IgE、IgDを使用することができる。具体的には、分析対象物がヒト血清アルブミンであれば、抗体として抗ヒト血清アルブミン抗体を使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を抗原とする場合には、例えば抗アトラジン抗体、抗カナマイシン抗体、抗メタンフェタミン抗体等の抗体を使用することができる。

【0028】酵素としては、分析対象物又は分析対象物から代謝される物質に対して活性を示すものであれば、特に限定されることなく、種々の酵素、例えば酸化還元酵素、加水分解酵素、異性化酵素、脱離酵素、合成酵素等を使用することができる。具体的には、分析対象物がグルコースであれば、グルコースオキシダーゼを、分析対象物がコレステロールであれば、コレステロールオキ

シダーゼを使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を分析対象物とする場合には、それらから代謝される物質と特異的反応を示す、例えばアセチルコリンエステラーゼ、カテコールアミンエステラーゼ、ノルアドレナリンエステラーゼ、ドーパミンエステラーゼ等の酵素を使用することができる。微生物、細菌としては、特に限定されることなく、大腸菌をはじめとする種々の微生物、細菌を使用することができる。

【0029】また、生理活性物質はDNA塩基鎖であってもよく、相補的な塩基鎖を特異的に結合させることができる。本発明の他の例による光学的分析装置用測定チップの断面概略図を図2に示す。本実施例による光学的分析装置用測定チップは、基板1と、基板1の上に形成された接着層3と、接着層3の上に並べられた官能基導入金属コロイド粒子2とを有する。このように接着層3を設けることにより、官能基導入金属コロイド粒子2を基板1に密着させることができるとともに、プリズムのみによる屈折率を所望の屈折率に補正することができる。また、場合によっては感度を向上させることもできる。

【0030】接着層3としては、シリカ( $\text{SiO}_2$ )、アルミナ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )等の酸化物や、各種遷移金属の酸化物、硫化物、炭化物、フッ化物等の材料からなる透明なものを用いることができ、プリズムの屈折率に応じて適宜選択すればよい。接着層3の厚さは、5nm以上、可視光の波長(300nm)以下であるのが好ましく、特に10~100nmであるのが好ましい。また、材料の粒径は、5~50nmであるのが好ましい。

【0031】接着層3の形成は、常法によって行えばよく、まず最初にシリカやアルミナ等の材料の分散液を調製する。例えばシリカの分散液を調製する場合には、テトラエトキシシラン5~20重量部と、塩酸1~5重量部と、イソプロピルアルコール80~150重量部とを混合し、10~30℃で2~16時間攪拌すればよい。これによって、所望の粒径を有するシリカを分散させた分散液(固形分1~10重量%)が得られる。また、アルミナの分散液を調製する場合には、テトラエトキシシランに代えてアルミナを用い、同様の条件で2~16時間超音波処理すればよい。

【0032】分散液が得られたら、これをディップコート法、スピニングコート法、あるいはメナスカスコーティング法等によって基板1にコーティングする。メナスカスコーティング法では、多孔性の管の内部に供給された分散液が管の表面に染み出して、基板との接触部でメナスカスを形成する。このとき、基板を定速で移動させることにより、均一なコーティング膜が得られる。この方法によれば、比較的少量の溶液で大面積の基板にコーティングすることができる。

【0033】本発明の光学的分析装置用測定チップは、一般的には、装置側に設置されたプリズム等の高屈折媒体 ( $n=1.4 \sim 2.3$ ) の上又は下に設置される (下に設置される場合には、測定チップは基板1が上側になる。)。この高屈折媒体と基板1との間には、必要に応じてシリコン、アクリル樹脂等、高屈折媒体と同等の屈折率を有する樹脂層を設け、高屈折媒体と基板1とを密着させてもよい。

【0034】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0035】(実施例1) 本実施例では、図1に示されるような構成を有する測定チップを作製した。

【0036】基板としては、厚さ0.15mmの透明なカバーガラス (18mm×18mm) を使用した。一方、金属コロイド粒子は、0.01%塩化金酸 ( $\text{HAuCl}_4$ ) の水溶液1000mlを煮沸し、1%クエン酸ナトリウム4mlを加え、さらに5分間煮沸した後、室温で放冷することにより得た。得られた金コロイド粒子の粒径は、平均18nmであった。

【0037】金コロイド粒子の含有量が3重量%となるように、上記金コロイド粒子をイソプロピルアルコールに分散させ、得られた分散液100.0gに、3-アミノプロピルトリエトキシシラン2.0gを添加した。この混合液を80℃で12時間加熱攪拌し、金コロイド粒子の表面にアミノ基を導入した。アミノ基導入金コロイド粒子を含む混合液を、金コロイド粒子が3重量%となるようにエチレングリコールモノエチルエーテルに添加し、これをスピンコート法により上記基板の上に塗布した。塗布後、70℃の温度、50%Rhの湿度の条件の下で1時間乾燥した。

【0038】(実施例2) 本実施例では、図2に示されるような構成を有する測定チップを作製した。基板としては、厚さ0.15mmの透明なカバーガラス (18mm×18mm) を使用した。

【0039】テトラエトキシシラン10.0gと、0.1N塩酸3.5gと、イソプロピルアルコール100.0gとを混合し、室温で8時間攪拌した。これによって、粒径30nm以下のシリカを分散させた分散液 (固形分3重量%) が得られた。このシリカ分散液を、スピンコート法により上記基板の上に塗布した。塗布後、70℃の温度、50%Rhの湿度の条件の下で1時間乾燥した。形成された接着層の厚さは、50nmであった。一方、アミノ基導入金コロイド粒子は、実施例1と同様にして調製し、上記接着層の上に塗布・乾燥した。

【0040】(実施例3) 本実施例では、図1に示されるような構成を有する測定チップを作製した。基板としては、厚さ0.15mmの透明なカバーガラス (18mm×18mm) を使用した。

【0041】一方、金属コロイド粒子は、0.01%塩化金

酸の水溶液1000mlを煮沸し、1%クエン酸ナトリウム4mlを加え、さらに5分間煮沸した後、室温で放冷することにより得た。得られた金コロイド粒子の粒径は、平均18nmであった。金コロイド粒子の含有量が3重量%となるように、上記金コロイド粒子をイソプロピルアルコールに分散させ、得られた分散液100.0gに2.0gの3-メルカプトプロピルトリエトキシシランを添加した。この混合液を80℃で12時間加熱攪拌し、金コロイド粒子の表面にメルカプト基を導入した。

【0042】メルカプト基導入金コロイド粒子を含む混合液を、金コロイド粒子が3重量%となるようにエチレングリコールモノエチルエーテルに添加し、これをスピンコート法により上記基板の上に塗布した。塗布後、70℃の温度、50%Rhの湿度の条件の下で1時間乾燥した。

【0043】(実施例4) 本実施例では、図2に示されるような構成を有する測定チップを作製した。基板としては、厚さ0.15mmの透明なカバーガラス (18mm×18mm) を使用した。

【0044】テトラエトキシシラン10.0gと0.1N塩酸3.5gとイソプロピルアルコール100.0gとを混合し、室温で8時間攪拌した。これによって、粒径30nm以下のシリカを分散させた分散液 (固形分3重量%) が得られた。このシリカ分散液を、スピンコート法により上記基板の上に塗布した。塗布後、70℃の温度、50%Rhの湿度の条件の下で1時間乾燥した。形成された接着層の厚さは、50nmであった。一方、メルカプト基導入金コロイド粒子は、実施例3と同様にして調製し、上記接着層の上に塗布・乾燥した。

【0045】(試験例1) 実施例1～4で得られた光学分析装置用測定チップを、ファルマシア製表面プラズモン共鳴測定装置BIAcore2000 用測定チップ Sensor Chip CM5 (research grade) のホルダーに固定し、該表面プラズモン共鳴測定装置で評価したところ、市販品と同等のシグナルを得ることができた。従って、上記チップに対してモノクローナル抗体の固定化を行うことにより、抗原の測定が可能となる。

【0046】(試験例2) 実施例1～4で得られた光学分析装置用測定チップについて、機械的強度を簡易に評価した。評価は、セロテープを測定チップ表面に貼った後、ゆっくり剥離し、そのときの表面の状態を観察する方法 (セロテープ剥離法) により行った。その結果、実施例2及び4で得られた測定チップは100% (剥離なし) であり、実施例1及び3で得られた測定チップは0% (全剥離) であった。また、同様の対象に対して、碁盤目試験法 (JIS K 5400) に準拠して剥離試験を行った。その結果、セロテープ剥離法と同様の結果を得ることができた。

【0047】

【発明の効果】本発明によれば、良好な感度を有する光学的分析装置用測定チップを、効率良く簡易に得ること

ができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一例による光学的分析装置用測定チップの断面模式図である。

【図2】本発明の他の例による光学的分析装置用測定チップの断面模式図である。

【図3】試薬として3-アミノプロピルトリエトキシシ

ランを使用した場合における、金属コロイド粒子の表面に導入されたアミノ基の状態を示す模式図である。

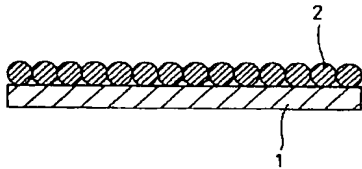
【符号の説明】

1…基板

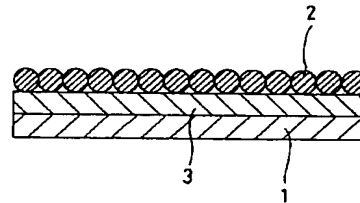
2…官能基導入金属コロイド粒子

3…接着層

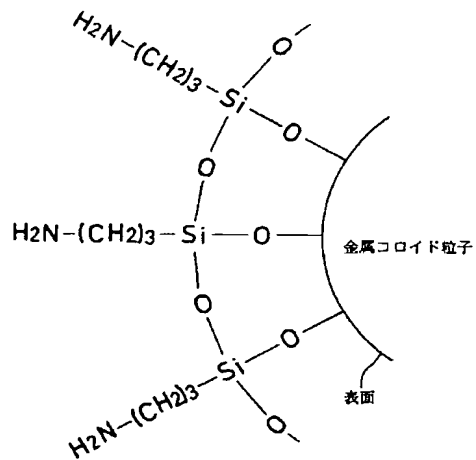
【図1】



【図2】



【図3】



# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-160737

(43)Date of publication of application : 19.06.1998

(51)Int.Cl.

G01N 33/553

C12M 1/00

C12Q 1/00

G01N 33/543

(21)Application number : 08-323098

(71)Applicant : DAINIPPON PRINTING CO LTD

(22)Date of filing : 03.12.1996

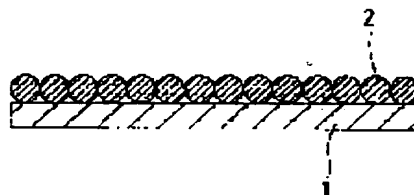
(72)Inventor : NAKAMURA RUNA  
YOSHIHARA TOSHIO  
NAGATA RYOHEI

## (54) MEASURING CHIP FOR OPTICAL ANALYZER AND ITS MANUFACTURE

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a measuring chip whose sensitivity is good and which can be manufactured with good efficiency by a method wherein a functional group is introduced into the surface of metal colloidal particles and the metal colloidal particles are arranged on a substrate in a most densely filled manner.

**SOLUTION:** A measuring chip is formed in such a way that metal colloidal particles 2 into which a functional group is introduced are arranged on a substrate 1. As the substrate 1, a material which is used usually as a measuring chip for an optical analyzer and which is transparent with reference to a laser beam, e.g. a glass or a plastic, is used. The thickness of the substrate 1 is preferably at about 0.1 to 5mm. In the colloidal particles 2, the functional group is introduced into the surface of the metal colloidal particles, and metal particles in a size of a colloidal size region (10 to 1000nm) are used. As a metal for the metal colloidal particles, gold, platinum, silver or the like is used, but gold is preferable. When the colloidal particles 2 which are prepared in this manner are used, a physiologically active substance which is coupled to the functional group is fixed to a position near a metal colloid, and the measuring sensitivity of the measuring chip can be enhanced.





## CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The measurement chip for optical analysis equipments characterized by arranging in on a substrate the metal colloidal particle which introduced the functional group into the front face in closest packing.

[Claim 2] The measurement chip for optical analysis equipments according to claim 1 said whose metal colloidal particle arranged in on a substrate is characterized by having not lapped in the vertical direction.

[Claim 3] The measurement chip for optical analysis equipments according to claim 1 characterized by preparing the glue line between said metal colloidal particles and substrates.

[Claim 4] The measurement chip for optical analysis equipments according to claim 1 characterized by said functional group being an amino group or a sulfhydryl group.

[Claim 5] The manufacture approach of the amino-group installation metal colloidal particle characterized by introducing the amino group into the front face of a metal colloidal particle by mixing at least one sort chosen from the dispersion liquid which distributed the metal colloidal particle, and the group which consists of 3-aminopropyl triethoxysilane, 3-aminopropyl trimethoxysilane, 3-aminopropyl diethoxy methylsilane, 3-(2-aminoethyl aminopropyl) trimethoxysilane, and 3-(2-aminoethyl aminopropyl) dimethoxymethylsilane.

[Claim 6] The manufacture approach of the sulfhydryl group installation metal colloidal particle characterized by introducing a sulfhydryl group into the front face of a metal colloidal particle by mixing the dispersion liquid which distributed the metal colloidal particle, and 3-mercapto propyltrimethoxysilane and/or dimethoxy-3-mercapto propyl methylsilane.

[Claim 7] The dispersion liquid which distributed the metal colloidal particle, and 3-aminopropyl triethoxysilane, 3-aminopropyl trimethoxysilane, 3-aminopropyl diethoxy methylsilane, At least one sort chosen from the group which consists of 3-(2-aminoethyl aminopropyl) trimethoxysilane and 3-(2-aminoethyl aminopropyl) dimethoxymethylsilane is mixed. The manufacture approach of the measurement chip for optical analysis equipments characterized by applying on a substrate without introducing the amino group into the front face of a metal colloidal particle, and mixing the obtained amino-group installation metal colloidal particle dispersion liquid with a solvent or mixing.

[Claim 8] The manufacture approach of the measurement chip for optical analysis equipments characterized by applying on a substrate without mixing the dispersion liquid which distributed the metal colloidal particle, and 3-mercapto propyltrimethoxysilane and/or dimethoxy-3-mercapto propyl methylsilane, introducing a sulfhydryl group into the front face of a metal colloidal particle, and mixing the obtained sulfhydryl group installation metal colloidal particle dispersion liquid with a solvent or mixing.

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the manufacture approach of the functional-group installation metal colloidal particle which can be used for the measurement chip for optical analysis equipments, its manufacture approach, and the measurement chip for optical analysis equipments.

[0002]

[Description of the Prior Art] Although many measurement which used the immunoreaction by the clinical laboratory test etc. is performed now, in the conventional method, the optical analysis equipment which can detect change of a physiological active substance to high sensitivity, for example, the immune sensor using surface plasmon resonance (SPR) etc., is used, without needing a marker, since complicated actuation and a complicated marker are needed.

[0003] Generally, the measurement chip in such optical analysis equipment has from the bottom the configuration which consists of a transparence substrate, a metal thin film, and an organic thin film, and comes to fix the physiological active substance according to an analysis object to an organic thin film. After the measurement chip which has such a configuration forms a metal thin film with vacuum deposition etc. on a substrate, it forms an organic thin film, gives a functional group to a metal thin film, and is manufacturing it by fixing various physiological active substances in the functional group. However, the conventional measurement chip of a long distance and sensibility was not enough as the distance of a metal thin film and a physiological active substance constitutionally. Moreover, also in the manufacture approach, actuation of vacuum deposition etc. was complicated and its membrane formation effectiveness was also bad.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The technical problem of this invention is offering the measurement chip for optical analysis equipments which can be manufactured efficiently, and its manufacture approach while having good sensibility.

[0005]

[Means for Solving the Problem] An example is taken by the above-mentioned technical problem. Wholeheartedly as a result of research this invention person etc. By introducing a functional group into the front face of a metal colloidal particle, and arranging the metal colloidal particle in on a substrate in closest packing If the liquid containing the metal colloidal particle which introduced the functional group into that sensibility becomes very high and a front face is applied on a substrate A header and this invention were completed for it not being necessary to form an organic thin film separately, and formation of a metal thin film and a functional group being performed to coincidence, it being efficient and a measurement chip being manufactured simply. That is, this invention is a measurement chip for optical analysis equipments characterized by arranging in on a substrate the metal colloidal particle which introduced the functional group into the front face in closest packing.

[0006] Moreover, this invention is the manufacture approach of the amino-group installation metal colloidal particle characterized by introducing the amino group into the front face of a metal colloidal particle by mixing at least one sort chosen from the dispersion liquid which distributed the metal colloidal particle, and the group which consists of 3-aminopropyl triethoxysilane, 3-aminopropyl trimethoxysilane, 3-aminopropyl diethoxy methylsilane, 3-(2-aminoethyl aminopropyl) trimethoxysilane, and 3-(2-aminoethyl aminopropyl) dimethoxymethylsilane.

[0007] Furthermore, this invention is the manufacture approach of the sulfhydryl group installation metal colloidal particle characterized by introducing a sulfhydryl group into the front face of a metal colloidal particle by mixing the dispersion liquid which distributed the metal colloidal particle, and 3-mercapto propyltrimethoxysilane and/or dimethoxy-3-mercapto propyl methylsilane.

[0008] Furthermore, dispersion liquid which this invention made distribute a metal colloidal

particle and 3-aminopropyl triethoxysilane, 3-aminopropyl trimethoxysilane, 3-aminopropyl diethoxy methylsilane, At least one sort chosen from the group which consists of 3-(2-aminoethyl aminopropyl) trimethoxysilane and 3-(2-aminoethyl aminopropyl) dimethoxymethylsilane is mixed. It is the manufacture approach of the measurement chip for optical analysis equipments characterized by applying on a substrate without introducing the amino group into the front face of a metal colloidal particle, and mixing the obtained amino-group installation metal colloidal particle dispersion liquid with a solvent or mixing.

[0009] Furthermore, this invention is the manufacture approach of the measurement chip for optical analysis equipments characterized by applying on a substrate without mixing the dispersion liquid which distributed the metal colloidal particle, and 3-mercaptopropyltrimethoxysilane and/or dimethoxy-3-mercaptopropyl methylsilane, introducing a sulfhydryl group into the front face of a metal colloidal particle, and mixing the obtained sulfhydryl group installation metal colloidal particle dispersion liquid with a solvent or mixing.

[0010]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, this invention is explained to a detail. The equipment which analyzes optically change of the physiological active substance according [ the optical analysis equipment in this invention ] to an interaction with an analysis object with the wavelength of light is said, for example, a surface plasmon resonance measurement machine, ultraviolet spectrometer, infrared spectrograph, a light spectroscopy, a fluorescence spectroscopy, Raman spectrograph, etc. correspond. Moreover, in the optical analysis equipment, the measurement chip for optical analysis equipments may say the member containing the optical part (part by which light is irradiated - reflected) with which an analysis object and a physiological active substance can interact, and may fix on the body of optical analysis equipment, and desorption may be possible for it.

[0011] The cross-section schematic diagram of the measurement chip for optical analysis equipments with an example of this invention is shown in drawing 1 . The measurement chip for optical analysis equipments by this example (it may abbreviate to a "measurement chip" hereafter) comes to arrange the functional-group installation metal colloidal particle 2 on a substrate 1. Generally it consists of a transparent ingredient, for example, glass, and plastics to laser light that what is necessary is just what is usually used for the measurement chip for optical analysis equipments as a substrate 1. The desirable thickness of a substrate 1 is about 0.1-5mm.

[0012] The functional-group installation metal colloidal particle 2 introduces a functional group into the front face of a metal colloidal particle. A metal colloidal particle means the metal particles in the magnitude of a colloid size field (10-1000nm). Although you may be what kind of thing as long as it is the metal which can perform optical analysis as a class of metal of a metal colloidal particle, it is independent, or gold, platinum, silver, aluminum, etc. are usually combined and used. Preferably, gold is used. By using such a functional-group installation metal colloidal particle 2, the physiological active substance combined with a functional group will be fixed to the location very near a metal colloidal particle, and sensitometry can be sharply raised rather than the case where a metal thin film-organic thin film is used.

[0013] A metal colloidal particle can be manufactured by the approach (Frens, G.:Nature Physical Sci.241, and 20-22 (1973)) of using a sodium citrate as a reducing agent, the approach (J. W.Slot, H.T.Geuze, :Eur.J.Cell.Biol.38, and 87-93 (1985)) using a sodium citrate and tannin, etc. By the former approach, after boiling water-solution 1000 part by volume of chloroauric acid (HAuCl<sub>4</sub>) 0.01 to 5%, for example, adding two to sodium-citrate 10 part by volume 0.1 to 5% and boiling for further 5 - 20 minutes, it cools radiationally at a room temperature. By this approach, the diameter of a colloidal particle is controlled by the addition of the sodium citrate which is a reducing agent. A diameter becomes large, so that there are few additions of a reducing agent.

[0014] With the latter approach, it is distilled water 395 first about the 0.01 - 5% chloroauric acid (HAuCl<sub>4</sub>) water-solution 5 weight section, for example. It mixes in the weight section and heats at 60 degrees C (solution X). Next, the 0.01 - 5% sodium-citrate water-solution 20 weight section and 0.01 - 5% tannic-acid water solution 2.5 The weight section and the distilled water 77.5 weight section are mixed, and it heats at 60 degrees C (solution Y). It heats until it mixes

promptly, and it boils Solution Y from yellow with the thin color of a solution, stirring the obtained solution X, after [ purple ] stirring until it is, and carries out and changes to red, and the target gold colloid particle is obtained. Besides these approaches, it can manufacture by an approach JP,55-15100,A, JP,4-142460,A, and given in JP,4-221761,A etc. Although you may be what kind of class as long as a desired physiological active substance is fixable to a metal colloidal particle as a class of functional group, the amino group or a sulfhydryl group is used preferably. Especially the amino group is desirable at the point that an aspartic acid, glutamic acid, etc. present firm association to C (carboxy) end of living body related substances, such as a physiological active substance contained in the primary structure or an antibody, and a nucleic acid, and especially a sulfhydryl group is desirable at the point that a cysteine, a methionine, etc. present firm association to the physiological active substance contained in the primary structure.

[0015] What is necessary is just to mix the dispersion liquid which distributed the metal colloidal particle, and the reagent (reagent for functional-group installation) which has a desired functional group, in order to introduce a functional group into the front face of a metal colloidal particle. As a solvent (this solvent is called solvent (a).) for distributing a metal colloidal particle, a water soluble solvent (alcohol, a ketone, the ether, or those derivatives), distilled water, or a surfactant water solution, for example, isopropyl alcohol etc., can be used. Solvent (a) As the amount used, what is necessary is just the amount from which a metal colloidal particle becomes about 0.1 - 10 % of the weight.

[0016] As a reagent in the case of introducing the amino group, it is independent respectively, or 3-aminopropyl triethoxysilane, 3-aminopropyl trimethoxysilane, 3-aminopropyl diethoxy methylsilane, 3-(2-aminoethyl aminopropyl) trimethoxysilane, 3-(2-aminoethyl aminopropyl) dimethoxymethylsilane, etc. can be mentioned, and it can be used, combining suitably. Moreover, as a reagent in the case of introducing a sulfhydryl group, it is independent respectively, or 3-mercapto propyltrimethoxysilane, dimethoxy-3-mercapto propyl methylsilane, etc. can be mentioned, and it can be used, combining suitably.

[0017] Although the amount of these reagents used, mixed temperature, etc. change with the classes of a metal colloidal particle or reagent, generally the amount of the reagent used is the metal colloidal particle 100. It is desirable that it is 1 - 10 weight section to the weight section, and, as for mixing, it is desirable to carry out by stirring for 6 to 24 hours at 50-90 degrees C generally. By using these reagents, a functional group is the front face 100 \*\*2 of a metal colloidal particle at an equal consistency. It is introduced into 1-10 hits. The functional group introduced into the front face of a metal colloidal particle is located in the outermost part. For example, when 3-aminopropyl triethoxysilane is used as a reagent, as shown in drawing 3 , it joins together in order of the metal colloidal particle-oxygen atom-silicon atom-alkyl group-amino group, and the amino group is located in the outermost part.

[0018] With the measurement chip of this invention, the functional-group installation metal colloidal particle 2 is located in a line in closest packing on the substrate 1. The functional group of an end occupies the outermost layer, and it means the condition that these functional groups are choked up densely, so that the "closest packing target" as used in the field of this invention does not have room for other molecules to intrude between metal colloidal particles. Thus, by arranging the functional-group installation metal colloidal particle 2 in on a substrate 1 in closest packing, a physiological active substance can be equally fixed by the high consistency, and sensitometry can be raised.

[0019] Moreover, as preferably shown in drawing 1 , the functional-group installation metal colloidal particle 2 is put in order so that it may not lap in the vertical direction, namely, so that it may become a monolayer. While being able to shorten distance of the analysis object which interacts with a physiological active substance by making it a monolayer, and the field which the light which carried out incidence reflects and obtaining good sensibility, the amount of the functional-group installation metal colloidal particle 2 to be used can be held down to necessary minimum, and reduction-ization of cost can be attained.

[0020] In order to arrange the functional-group installation metal colloidal particle 2 in on a substrate 1 in closest packing, the liquid containing the functional-group installation metal

colloidal particle 2 of optimum dose is applied on a substrate 1 with a conventional method. Namely, what is necessary is to mix the dispersion liquid which distributed the metal colloidal particle, and the reagent for functional-group installation, to introduce a functional group into the front face of a metal colloidal particle, to apply the obtained functional-group installation metal colloidal particle dispersion liquid as it is, or to mix with a suitable solvent (for this solvent to be called solvent (b).), and just to apply.

[0021] Solvent (b) If it carries out, water soluble solvents, such as alcohols, a ketone, the ether, or those derivatives, water or the various buffer solutions, etc. can be used. Solvent (b) Solvent used by whether it is used or not again (b) With a class or an amount, the volatilization rate (formation rate of a metal colloidal particle layer) of a solvent (a solvent (a) or a solvent (a), and (b)) can be changed. Solvent (b) When using it, it is desirable that the concentration of the metal colloidal particle 2 uses 0.5 to 20% of the weight so that the concentration of 3 – 5 % of the weight and the reagent for functional-group installation may become 3 – 5 % of the weight especially 0.5 to 20% of the weight. The concentration of the metal colloidal particle 2 can make a substrate cover in closest packing that the concentration of the reagent for functional-group installation is 0.5 – 20 % of the weight by at least one or more metal colloidal particle layers at 0.5 – 20 % of the weight. Moreover, the concentration of the metal colloidal particle 2 can make a substrate cover in closest packing that the concentration of the reagent for functional-group installation is 3 – 5 % of the weight by the metal colloidal particle of a monolayer at 3 – 5 % of the weight.

[0022] As the method of application, a dip coating method, a spin coat method, an electrodeposition process, \*\*\*\*\*, etc. are mentioned, for example. Although the desiccation conditions at the time of performing a dip coating method, a spin coat method, etc. change with classes of used solvent, they are especially 70% or more, and it is [ 50% or more of humidity ] desirable to heat below neglect or 80 degrees C to a room temperature. Especially, it is a solvent (b). When it carries out and ethylene glycol monoethyl ether is used, it is desirable to heat at 40 – 60% of humidity and 70–90 degrees C. Moreover, when ethylene-glycol-monobutyl-ether acetate is used, it is desirable to heat at 50 – 80% of humidity and 70–90 degrees C.

[0023] When performing an electrodeposition process, it is necessary to prepare ITO (Indium Oxide and Tin Oxide) which is a transparent electrode on a substrate 1, and since it is amendment of a refractive index, it is desirable to prepare a silica layer between ITO and the functional-group installation metal colloidal particle 2 further. Moreover, when performing \*\*\*\*\*, it is desirable to prepare an alumina layer between a substrate 1 and the functional-group installation metal colloidal particle 2 because of improvement in an adhesive property. The reagent for functional-group installation of a silane system has the following physical properties. That is, in a solvent, the reagent of a silane system serves as a lump (particle) of 5 – a hexamer with the reactant height of a silane part, and is distributed. The particle system used as this 5 – a hexamer has an almost uniform particle size (distribution) by work of autoagglutination ability.

[0024] If this reagent is applied on a substrate 1, the gestalt which turned the amino group to the outer layer by the equal consistency will be presented under the effect of the forward electric charge which a functional group has, the high reactivity of a silane part, parents, hydrophobic balance, etc. \*\*\*\* [ volatilization of a solvent / begin / the remaining reagent / and / according to the Van der Waals force of molecules / autoagglutination ] The part which was shrunken by condensation and the opening produced more newly than the overlapping reagent layer or the overlapping adjacent part receives supply of a reagent (layer), and begins crystal growth on the basis of a hexagon. By using such a reagent, the functional-group installation metal colloidal particle 2 can be further located in a line by the monolayer in closest packing on a substrate 1. It can prove also by the following experiments that the functional-group installation metal colloidal particle 2 is located in a line in closest packing on a substrate 1.

[0025] The propyl triethoxysilane which does not have an amino group is used instead of 3-aminopropyl triethoxysilane, and a metal colloidal particle is applied on a substrate 1 by the same approach as this invention. The propyl triethoxysilane used here is a compound which has strong hydrophobicity, and by dropping of distilled water by the syringe, a front face gets wet and it can

grasp extent. In order that the front face which applied the metal colloidal particle by the same approach as this invention may flip waterdrop uniformly, it turns out that the metal colloidal particle has covered the whole substrate in at least one or more layers. In addition, when a front face does not flip partial waterdrop, the water-repellent front face and the hydrophilic front face are intermingled, and it is thought that the metal colloidal particle has not covered the whole substrate to homogeneity.

[0026] A physiological active substance is combined and fixed by the functional group introduced into the metal colloidal particle 2. What is necessary is just to perform immobilization of a physiological active substance with a conventional method. For example, it is fixable by making a functional-group installation metal colloidal particle carry out predetermined time contact of the physiological active substance of the specified quantity. What is necessary is to pour the physiological active substance of constant flow predetermined time (specified quantity), and just to make a functional-group installation metal colloidal particle contact, if the measurement cell of optical analysis equipment is a flow cell mold.

[0027] As a physiological active substance, especially if it can interact with an analysis object, it will not be limited, for example, immune proteins, an enzyme, a microorganism, bacteria, etc. will be mentioned. As immune proteins, the antibody which uses an analysis object as an antigen, for example can be used. Various immunoglobulins, i.e., IgG, IgM, IgA, IgE, and IgD, can be used without being limited also especially as an antibody. If an analysis object is a human serum albumin, specifically, an anti-human serum albumin antibody can be used as an antibody. Moreover, when using agricultural chemicals, an insecticide, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, an antibiotic, narcotics, cocaine, heroin, a crack, etc. as an antigen, antibodies, such as for example, an anti-Atrazine antibody, an anti-kanamycin antibody, and an anti-methamphetamine antibody, can be used.

[0028] Various enzymes, for example, an oxidoreductase, hydrolase, isomerase, lyase, synthetic enzyme, etc. can be used without being especially limited, if activity is shown as an enzyme to the matter metabolized from an analysis object or an analysis object. If an analysis object is a glucose and an analysis object is cholesterol about glucose oxidase, specifically, cholesterol oxidase can be used. Moreover, when using agricultural chemicals, an insecticide, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, an antibiotic, narcotics, cocaine, heroin, a crack, etc. as an analysis object, the matter and specific reaction which are metabolized from them are shown, for example, enzymes, such as acetylcholineesterase, catecholamine esterase, noradrenalin esterase, and dopamine esterase, can be used. Especially as a microorganism and bacteria, various microorganisms including *Escherichia coli* and bacteria can be used, without being limited.

[0029] Moreover, a physiological active substance may be a DNA base chain, and can combine a complementary base chain specifically. The cross-section schematic diagram of the measurement chip for optical analysis equipments by other examples of this invention is shown in drawing 2. The measurement chip for optical analysis equipments by this example has a substrate 1, the glue line 3 formed on the substrate 1, and the functional-group installation metal colloidal particle 2 arranged in on a glue line 3. Thus, while being able to stick the functional-group installation metal colloidal particle 2 to a substrate 1 by forming a glue line 3, the refractive index only by prism can be amended to a desired refractive index. Moreover, sensibility can also be raised depending on the case.

[0030] What is necessary is to be able to use the transparent thing which consists of ingredients, such as oxides, such as a silica ( $\text{SiO}_2$ ) and an alumina (aluminum  $2\text{O}_3$ ), and an oxide of various transition metals, a sulfide, carbide, a fluoride, as a glue line 3, and just to choose suitably according to the refractive index of prism. As for the thickness of a glue line 3, it is desirable that they are 5nm or more and below the wavelength (300 nm) of the light, and it is desirable that it is especially 10 – 100 nm. Moreover, as for the particle size of an ingredient, it is desirable that it is 5–50nm.

[0031] The dispersion liquid of ingredients, such as a silica and an alumina, are prepared first that what is necessary is just to perform formation of a glue line 3 with a conventional method. For example, when preparing the dispersion liquid of a silica, it is [ the tetra-ethoxy silane 5 – 20 weight sections, a hydrochloric acid 1 – 5 weight sections, and ] isopropyl alcohol 80–150. What

is necessary is to mix the weight section and just to stir at 10–30 degrees C for 2 to 16 hours. The dispersion liquid (1 – 10 % of the weight of solid content) which distributed the silica which has a desired particle size by this are obtained. Moreover, what is necessary is to replace with a tetra-ethoxy silane and just to ultrasonicate on the same conditions for 2 to 16 hours using an alumina, in preparing the dispersion liquid of an alumina.

[0032] If dispersion liquid are obtained, a substrate 1 will be coated with this with a dip coating method, a spin coat method, or a meniscus coating method. In a meniscus coating method, the dispersion liquid supplied to the interior of porous tubing ooze out on the surface of tubing, and form a meniscus in the contact section with a substrate. At this time, the uniform coating film is obtained by moving a substrate by constant speed. According to this approach, the substrate of a large area can be coated with a comparatively little solution.

[0033] Generally the measurement chip for optical analysis equipments of this invention is installed on high refractive media ( $n=1.4\text{--}2.3$ ), such as prism installed in the equipment side, or in the bottom (when installed downward, as for a measurement chip, a substrate 1 turns up.). If needed, between this high refractive medium and substrate 1, silicone, acrylic resin, etc. may prepare the resin layer which has a refractive index equivalent to a high refractive medium, and may stick a high refractive medium and a substrate 1 in it.

[0034]

[Example] Hereafter, although an example explains this invention still more concretely, the range of this invention is not limited to these examples.

[0035] (Example 1) In this example, the measurement chip which has a configuration as shown in drawing 1 was produced.

[0036] As a substrate, the transparent cover glass (18mmx18mm) with a thickness of 0.15mm was used. On the other hand, the metal colloidal particle was obtained by cooling radiationally at a room temperature, after having boiled 1000ml of water solutions of chloroauric acid ( $\text{HAuCl}_4$ ) 0.01%, adding 4ml of sodium citrates 1% and boiling for 5 more minutes. The particle size of the obtained gold colloid particle was an average of 18nm.

[0037] Isopropyl alcohol was made to distribute the above-mentioned gold colloid particle, and 3-aminopropyl triethoxysilane 2.0 g was added to obtained dispersion-liquid 100.0 g so that the content of a gold colloid particle might become 3 % of the weight. Heating stirring of this mixed liquor was carried out at 80 degrees C for 12 hours, and the amino group was introduced into the front face of a gold colloid particle. The mixed liquor containing an amino-group installation gold colloid particle was added to ethylene glycol monoethyl ether so that a gold colloid particle might become 3 % of the weight, and this was applied on the above-mentioned substrate with the spin coat method. It dried under the conditions of the temperature of 70 degrees C, and the humidity of 50%Rh after spreading for 1 hour.

[0038] (Example 2) In this example, the measurement chip which has a configuration as shown in drawing 2 was produced. As a substrate, the transparent cover glass (18mmx18mm) with a thickness of 0.15mm was used.

[0039] Tetra-ethoxy silane 10.0g, 0.1 N hydrochloric-acid 3.5 g, and isopropyl alcohol 100.0 g were mixed, and it stirred at the room temperature for 8 hours. The dispersion liquid (3 % of the weight of solid content) which distributed the silica with a particle size of 30nm or less were obtained by this. These silica dispersion liquid were applied on the above-mentioned substrate with the spin coat method. It dried under the conditions of the temperature of 70 degrees C, and the humidity of 50%Rh after spreading for 1 hour. The thickness of the formed glue line was 50nm. On the other hand, the amino-group installation gold colloid particle was prepared like the example 1, and was applied and dried on the above-mentioned glue line.

[0040] (Example 3) In this example, the measurement chip which has a configuration as shown in drawing 1 was produced. As a substrate, the transparent cover glass (18mmx18mm) with a thickness of 0.15mm was used.

[0041] On the other hand, the metal colloidal particle was obtained by cooling radiationally at a room temperature, after having boiled 1000ml of water solutions of chloroauric acid 0.01%, adding 4ml of sodium citrates 1% and boiling for 5 more minutes. The particle size of the obtained gold colloid particle was an average of 18nm. Isopropyl alcohol was made to distribute the above-

mentioned gold colloid particle, and 3-mercaptopropyltrimethoxysilane of 2.0 g was added to obtained dispersion-liquid 100.0 g so that the content of a gold colloid particle might become 3 % of the weight. Heating stirring of this mixed liquor was carried out at 80 degrees C for 12 hours, and the sulfhydryl group was introduced into the front face of a gold colloid particle.

[0042] The mixed liquor containing a sulfhydryl group installation gold colloid particle was added to ethylene glycol monoethyl ether so that a gold colloid particle might become 3 % of the weight, and this was applied on the above-mentioned substrate with the spin coat method. It dried under the conditions of the temperature of 70 degrees C, and the humidity of 50%Rh after spreading for 1 hour.

[0043] (Example 4) In this example, the measurement chip which has a configuration as shown in drawing 2 was produced. As a substrate, the transparent cover glass (18mmx18mm) with a thickness of 0.15mm was used.

[0044] Tetra-ethoxy silane 10.0g, 0.1 N hydrochloric-acid 3.5 g, and isopropyl alcohol 100.0 g were mixed, and it stirred at the room temperature for 8 hours. The dispersion liquid (3 % of the weight of solid content) which distributed the silica with a particle size of 30nm or less were obtained by this. These silica dispersion liquid were applied on the above-mentioned substrate with the spin coat method. It dried under the conditions of the temperature of 70 degrees C, and the humidity of 50%Rh after spreading for 1 hour. The thickness of the formed glue line was 50nm. On the other hand, the sulfhydryl group installation gold colloid particle was prepared like the example 3, and was applied and dried on the above-mentioned glue line.

[0045] (Example 1 of a trial) About the measurement chip for optical-analysis equipments obtained in the examples 1-4, it is the Pharmacia manufacture surface plasmon resonance measuring device BIAcore2000. \*\* measurement chip Sensor Chip CM5 (research grade) When it fixed to the electrode holder and this surface plasmon resonance measuring device estimated, the signal equivalent to a commercial item was able to be obtained. Therefore, measurement of an antigen is attained by fixing a monoclonal antibody to the above-mentioned chip.

[0046] (Example 2 of a trial) About the measurement chip for optical-analysis equipments obtained in the examples 1-4, the mechanical strength was evaluated simply. After evaluation stuck the Scotch tape on the measurement chip front face, it exfoliated slowly and was performed by the approach (the Scotch tape exfoliating method) of observing the condition of the front face at that time. Consequently, the measurement chip obtained in the examples 2 and 4 was 100 % (with no exfoliation), and the measurement chip obtained in the examples 1 and 3 was 0% (all exfoliations). Moreover, based on the cross cut adhesion test method (JIS K 5400), the friction test was performed to the same object. Consequently, the same result as the Scotch tape exfoliating method was able to be obtained.

[0047]

[Effect of the Invention] According to this invention, the measurement chip for optical analysis equipments which has good sensibility can be obtained simply efficiently.



ができる。

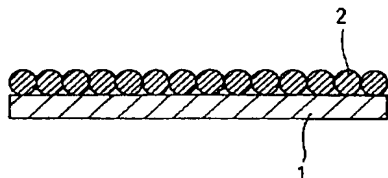
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一例による光学的分析装置用測定チップの断面模式図である。

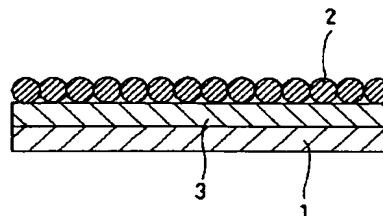
【図2】本発明の他の例による光学的分析装置用測定チップの断面模式図である。

【図3】試薬として3-アミノプロピルトリエトキシシ

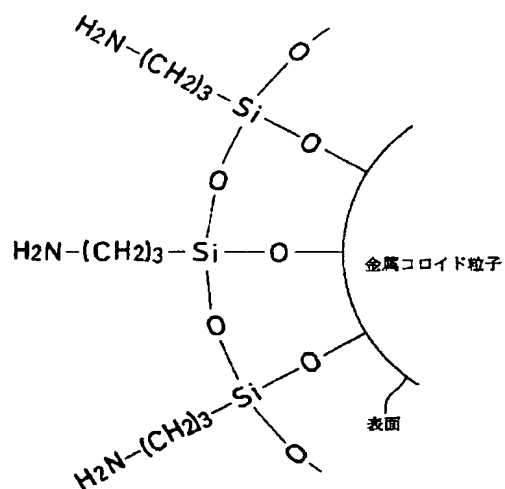
【図1】



【図2】



【図3】



ランを使用した場合における、金属コロイド粒子の表面に導入されたアミノ基の状態を示す模式図である。

【符号の説明】

- 1…基板
- 2…官能基導入金属コロイド粒子
- 3…接着層